

KARAKTERISASI SENYAWA ANTIMIKROBA ISOLAT *Aspergillus* sp. HASIL ISOLASI DARI TANAH

CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS OF *Aspergillus* sp. ISOLATED FROM SOIL

Noer Kasanah, Amini dan Wahyono

Lab. Mikrobiologi Farmasi, Fak. Farmasi Universitas Gadjah Mada

ABSTRAK

Berdasarkan hasil uji dengan metode plug diketahui bahwa isolat fungi *Aspergillus* sp hasil skrining dari tanah mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh *Aspergillus* sp.

Karakteristik dilakukan dengan metode analisis sistematik antibiotik, kromatografi dengan variasi pH, identifikasi secara fisik dan kimia dan uji aktivitasnya pada beberapa mikrobia uji secara in vitro.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa tersebut dapat digolongkan sebagai antibiotik yang menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif tidak aktif terhadap fungi. Senyawa tersebut bersifat polar, netral, merupakan senyawa aromatis dengan gugus hidroksi dan lakton.

Kata kunci : senyawa antimikroba, *Aspergillus* sp., mikroorganisme tanah

ABSTRACT

Based on a plug assay method, fungus *Aspergillus* sp from soil screening has been identified to have an ability to inhibit the growth of other microorganism. The aim of this research was to characterize antimicrobial compounds from this fungus.

Characterization was carried out by systematic analysis of antibiotic, pH chromatography, physical and chemical identifications, and bioassay on several tested microorganisms by agar diffusion method.

The results have shown that compound from *Aspergillus* sp could be classified as antibiotic, which inhibits Gram-positive and negative bacteria but inactive against fungus. The compound was a polar, neutral, and aromatic compound with hydroxyl and lactone groups.

Key word : antimicrobial compounds, *Aspergillus* sp., soil microorganism

PENDAHULUAN

Mikroorganisme menghasilkan banyak sekali senyawa yang bermanfaat untuk manusia. Senyawa-senyawa dengan struktur yang rumit dapat disintesis sempurna oleh mikroorganisme dalam waktu singkat (Kobinata & Osada, 1998). Senyawa-senyawa yang sangat berharga dalam

industri farmasi misalnya antibiotik dan vitamin dihasilkan oleh mikroorganisme (Steele, 1991, Omura, 1986). Mikroorganisme yang digunakan dalam kepentingan industri pada awalnya merupakan hasil skrining dari mikroorganisme alam yang kemudian mengalami rekayasa sedemikian rupa sehingga dapat menghasilkan produk dalam jumlah besar untuk kepentingan industri (Atlas & Brown, 1984).

Untuk menemukan senyawa baru dari mikroorganisme sangat penting untuk melakukan isolasi strain baru atau spesies baru dari mikroorganisme (Omura, 1986). Dengan pendekatan skrining sejumlah isolat yang kemungkinan menghasilkan antibiotik dapat diperoleh dari alam. Isolat yang terbukti menghasilkan antibiotik, dipelajari lebih lanjut untuk penentuan strukturnya dan kemungkinan adanya aktivitas lain selain antibiotik, mengingat beberapa antibiotik juga mempunyai aktivitas sebagai antikanker, antinematoda, inhibitor enzim (Madigan, 1997).

Pada penelitian telah berhasil diisolasi fungi *Aspergillus* sp yang mempunyai kemampuan menghambat mikroorganisme lain. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa yang dihasilkan oleh fungi tersebut. Karakterisasi dilakukan dengan berbagai macam cara. Analisis sistematik antibiotik dilakukan untuk mengetahui senyawa tersebut termasuk antibiotik yang baru atau sudah diketahui. Kromatografi dengan variasi pH untuk mengetahui senyawa tersebut bersifat asam, basa, netral atau amfoter. Uji aktivitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa tersebut menghambat mikroorganisme lain (Betina, 1983).

METODOLOGI

Bahan : Isolat fungi No. XXIII yang telah diidentifikasi sebagai *Aspergillus* sp oleh Lab. Mikrobiologi Fak. Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada.

Jalan penelitian

Fermentasi. Dilakukan proses fermentasi *Aspergillus* sp dalam media Czapek Dox (Difco) dan air rendaman jagung selama 4 hari, digojog 150 rpm. Setelah empat hari dilakukan pemanenan hasil fermentasi. Hasil fermentasi disentrifugasi untuk memisahkan biomassa dan filtrat.

Isolasi. Filtrat fermentasi dikumpulkan, dipekatkan kemudian diekstraksi dengan etilasetat. Ekstrak etilasetat digunakan untuk analisis lebih lanjut.

Analisis sistematik antibiotik. Ekstrak etilasetat dikromatografi dengan fase diam selulosa dan fase gerak umum dan khusus. Fase gerak umum yang digunakan adalah air, butanol, etil asetat dan benzen. Fase gerak khusus yang digunakan adalah (a). 3% ammonium klorida dalam air. (b). Isoamil asetat - metanol - 99% asam format - air (65:20:5:10). (c). n-butil asetat - metil etil keton - 0,15 M buffer fosfat pH 7,4 (50:25:5). (d). Etil asetat - heksan - buffer fosfat pH 6 (65:15:20). Deteksi kromatogram secara bioautografi dengan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sebagai mikrobial indikator.

Kromatografi dengan variasi pH. Kromatografi dilakukan dengan menggunakan fase diam selulosa yang telah dielusi dengan larutan buffer pH 2-10. Fase gerak yang digunakan untuk pengembangan adalah etilasetat jenuh air. Deteksi kromatogram dilakukan secara bioautografi dengan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sebagai mikrobial indikator.

Analisis spektra. Ekstrak etil asetat diuapkan sampai habis, sisa penguapan dilarutkan dalam etanol kemudian dilihat spektranya dengan spektrofotometer UV / VIS. Spektranya dibandingkan dengan antibiotik kloramfenikol karena termasuk dalam kelas yang sama.

Analisis kimia. Analisis kimia dilakukan dengan kromatografi, menggunakan fase diam silika gel F 254, fase gerak etil asetat : heksan (6,5 : 3,5) dan dideteksi dengan berbagai macam pereaksi semprot : a. Vanilin-asam sulfat, b. Natrium nitroprusid, c. Ferri chlorid, d. Ninhidrin, e. Serum sulfat-asam sulfat

Uji aktivitas. Uji aktivitas dilakukan dengan metode difusi agar. Filtrat fermentasi sebanyak 10 ul ditetaskan pada kertas samir yang diletakkan di atas media nutrien agar yang telah dicampur dengan suspensi mikrobial uji.

HASIL DAN PEMBAHASAN

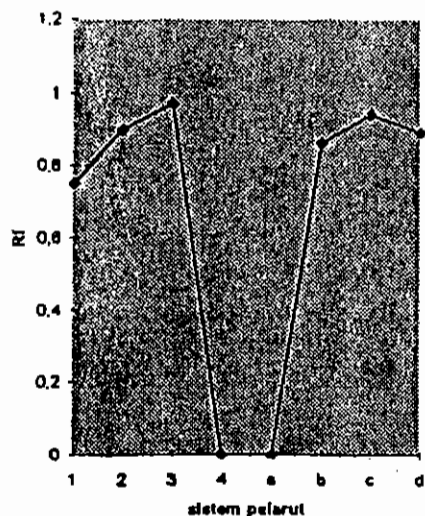
Analisis sistematik kromatografi

Analisis ini didasarkan pada sifat polaritas suatu antibiotik yang tidak diketahui. Antibiotik akan menunjukkan pola kromatogram yang berbeda tergantung pada jenis antibiotik tersebut. Pada awalnya sistem pelarut yang digunakan adalah sama yaitu : air, butanol, etil asetat dan benzen. Berdasarkan pola kromatogram pada empat sistem pelarut tersebut, ditentukan sistem pelarut yang khusus. Pada penelitian ini, pola kromatogram dengan empat sistem pelarut yang pertama menunjukkan kepada kelas II sehingga sistem pelarut yang selanjutnya merupakan sistem pelarut khusus untuk kelas II. Hasil analisis sistematik kromatografi terhadap antibiotik yang dihasilkan oleh isolat *Aspergillus sp* tersaji pada tabel 1 dan gambar 1. Pola kromatogram beberapa antibiotik yang termasuk dalam kelas II terlihat pada gambar 2.

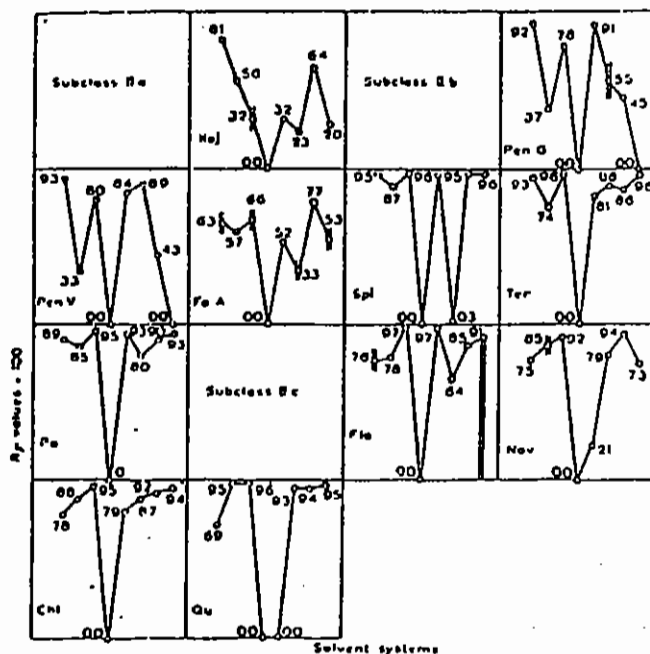
Tabel I. Tabel hasil analisis sistematik kromatografi

Fase gerak		Harga Rf
1	= air	0,75
2	= butanol	0,90
3	= etil asetat	0,97
4	= benzen	0,0
a	= 3% Ammonium klorida	0,0
b	= Isomail asetat : metanol : 99% as. Format air (65:20:10).	0,86
c	= n-butylasetat : metil etil keton : 0,15 M buffer fosfat pH 7,4 (50:25:5).	0,94
d	= etil asetat : n heksan : 0,15 M buffer fosfat pH 6(65:15:20)	0,89

Untuk menggambarkan pola kromatogram dibuat grafik antara sistem pelarut dengan harga Rf. Hasilnya seperti terlihat dibawah ini.



Gambar 1. Grafik analisis sistematik kromatografi antibiotik. Fase diam : selulos, fase gerak : seperti tercantum dalam tabel deteksi secara bioautografi dengan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sebagai mikrobial indikator dalam media nutrisi agar.



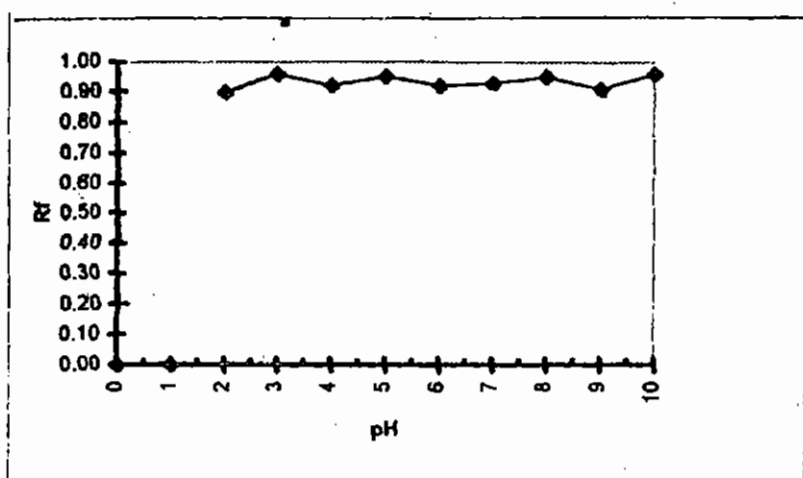
Gambar 2. Pola kromatogram antibiotik golongan II

Dari grafik tersebut dapat disimpulkan dua hal yaitu : 1. Antibiotik bersifat polar karena memiliki harga R_f yang menaik pada sistem pelarut yang polar. 2. Antibiotik termasuk jenis baru karena pola kromatogramnya tidak terdapat kesamaan dengan antibiotik yang termasuk dalam kelas IIc. Pola kromatogram pada empat sistem pelarut pertama mirip kloramfenikol, tetapi pada empat sistem pelarut yang lain polanya berbeda sama sekali.

Kromatografi dengan variasi pH

Kromatografi dengan variasi pH merupakan cara untuk mengetahui apakah antibiotik bersifat asam, basa, netral atau amfoter. Hasil kromatografi pH terhadap antibiotik yang dihasilkan oleh *Aspergillus sp* tersaji pada gambar 3.

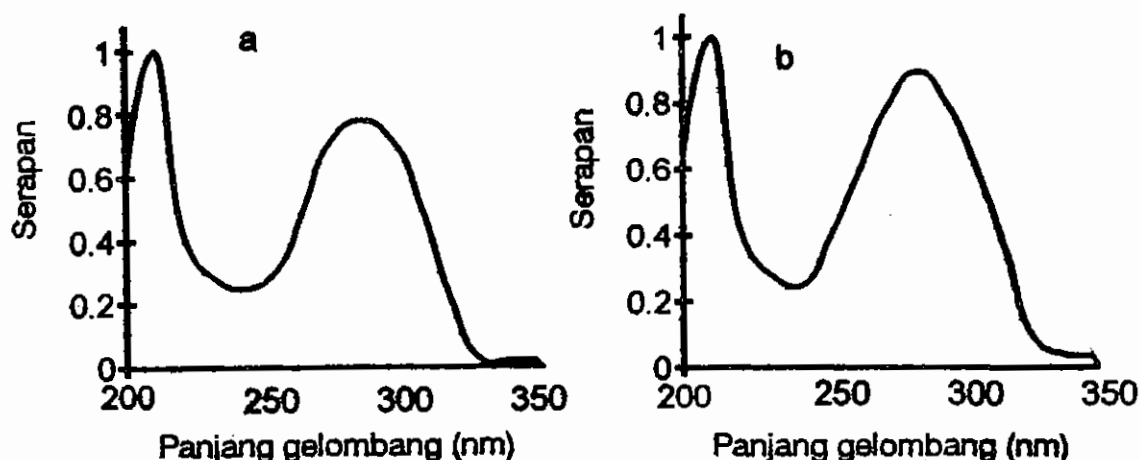
Dari grafik tersebut terlihat bahwa harga R_f berkisar pada angka 0,9 - 0,96 sehingga apabila dibuat garis pada hubungan pH dan R_f akan membentuk garis yang hampir lurus. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa antibiotik bersifat netral.



Gambar 3. Grafik hasil kromatografi pH pada fase diam selulosa, fase gerak etil asetat, deteksi bioautografi dengan *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Analisis dengan uv-vis spektrofotometer, dan kromatografi lapis tipis.

Analisis ini dilakukan untuk mengetahui serapan maksimum antibiotik pada daerah uv atau visibel. Pada analisis spektra ini dibandingkan dengan antibiotik kloramfenikol yang termasuk dalam kelas yang sama dengan antibiotik yang diidentifikasi. Hasil dari analisis ini dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Hasil analisis spektra (a) senyawa yang dianalisis, (b) kloramfenikol

Hasil dari analisis spektra menunjukkan pola yang sama dengan kloramfenikol yaitu antibiotik yang diidentifikasi menyerap sinar uv pada daerah 280 nm. Berdasarkan hal ini dapat disimpulkan bahwa antibiotik dari *Aspergillus sp* memiliki gugus kromofor yang sama dengan kloramfenikol sehingga serapan maksimumnya sama. Gugus kromofor yang mungkin menyerap pada daerah 280 nm adalah senyawa aromatis.

Untuk lebih meyakinkan bahwa antibiotik dari *Aspergillus sp* bukan kloramfenikol, maka dilakukan kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak etil asetat : heksan (65:35). Kromatogram dideteksi dibawah lampu uv. Bercak yang tampak ternyata berbeda antara kloramfenikol dengan antibiotik dari *Aspergillus sp*. Bercak pada kloramfenikol memiliki harga $R_f = 0,48$ sedang bercak antibiotik yang diidentifikasi memiliki $R_f = 0,65$. Berdasarkan hasil tersebut disimpulkan bahwa antibiotik dari *Aspergillus sp* bukan kloramfenikol, tetapi memiliki serapan maksimum yang sama dengan kloramfenikol, dengan polaritas lebih rendah.

Analisis kimia

Analisis kimia dilakukan dengan melakukan deteksi pada kromatogram dengan pereaksi semprot untuk gugus kimia tertentu. Hasil dari analisis dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel II. Hasil deteksi kromatogram dengan berbagai pereaksi semprot

Pereaksi	Deteksi untuk	Hasil
$FeCl_3$	fenol	biru (positif)
Ninhidrin	amina	negatif
Na nitroprusid	amin sekunder	negatif
Vanillin-as sulfat	lakton, alkohol	ungu (positif)
Serium sulfat	alkaloid	negatif

Berdasarkan hasil tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa antibiotik yang diidentifikasi memiliki gugus fenol dan lakton, tidak mengandung gugus amin. Hal ini bila dikaitkan dengan

sifat antibiotik yang bersifat polar sangat sesuai karena adanya gugus OH akan menentukan kepolaran suatu senyawa.

Uji aktivitas

Hasil uji aktivitas antibiotik terhadap berbagai mikrobia tersaji pada tabel 3.

Tabel III. Data diameter hambatan pertumbuhan beberapa mikrobia uji oleh filtrat fermentasi

Mikrobia uji	Diameter hambatan (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	35 ± 6
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	30 ± 3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	27 ± 2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12 ± 5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0

Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa tersebut aktif terhadap bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*) dan Gram negatif (*Escherichia coli*) tetapi tidak aktif terhadap fungi (*Candida albicans*)

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa antibiotik yang dihasilkan oleh *Aspergillus sp* mempunyai karakteristik : bersifat netral, polar, memiliki gugus fenol dan lakton, menyerap sinar uv pada 280 nm.

Ucapan terima kasih.

Ditujukan kepada Lembaga Penelitian UGM yang telah membiayai penelitian melalui anggaran OPF 1996/1997 dan Anggaran rutin M.A. 5250 tahun 1997/1998.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R.M dan Brown, A.E., 1984, *Experimental Microbiology: Fundamental and Application*, Macmillan Publishing, New York.
- Betina, V., 1983, *The Chemistry and Biology of Antibiotics*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam

Kasanah, N., 1998, *Identifikasi Lanjut terhadap Antibiotik yang Dihasilkan oleh Aspergillus sp Hasil Isolasi dari alam*, Laporan Penelitian, Lembaga Penelitian UGM.

Kobinata, K dan Osada, H., 1998, *Exploitation and Rapid Detection Method of Bioactive Compound from Microorganism in Proceedings of International Conference on Asian Network on Microbial Researcher*, Gadjah Mada University.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 1997, *Biology of Microorganism*, 8th ed, Prentice Hall, USA

Omura, S., 1986, *Philosophy of New Drug Discovery in Microbiological Review no 50*, American Society for Microbiology p.259-279

Steele, D.B., 1991, *Techniques for Selelection of Industrial Important Microorganism in Ann. Rev. Microbiol.* 45.